

Ю. И. КОЖУРО, М. В. АНИСОВИЧ, В. Ю. АФОНИН

ВЛИЯНИЕ ТРИАЗИНОВЫХ ГЕРБИЦИДОВ СИМАЗИНА И СЕМЕРОНА НА КЛЕТКИ ЛЕЙКОЦИТАРНОГО РЯДА ПОЙКИЛОТЕРМНЫХ ЖИВОТНЫХ

При действии гербицидов триазинового ряда симазина и семерона на травяных лягушек (*Rana temporaria* L.) не зарегистрировано увеличения количества лейкоцитов с абберациями хромосом. Продемонстрировано, что лейкоциты амфибий отличаются от эритроцитов периферической крови по степени цитогенетического ответа на дополнительное воздействие, что может быть объяснено различной скоростью элиминации клеток с повреждениями генетического аппарата, различной скоростью их пролиферации и дифференцировки. Для выявления особенностей действия факторов различной природы на генетический аппарат амфибий представляется предпочтительным использовать эритроциты периферической крови. Установлено, что симазин и семерон вызывают изменения в субпопуляционном составе лейкоцитов. При действии симазина в весенний период в селезенке наблюдается повышенное содержание нейтрофилов, что связано, вероятно, с замедлением процесса выхода животных из зимней спячки. Кроме того, симазин вызывал эозинофилию, что можно объяснить запуском процесса клеточной гибели. Семерон в изученных концентрациях оказывал общее цитотоксическое действие на лейкоциты животных. На фоне ярко выраженной нейтро- и эозинопении зарегистрировано снижение количества лейкоцитов с абберациями хромосом. Выявлены сезонные различия в количестве и характере вызываемых изменений у амфибий, подвергшихся воздействию гербицидов.

Ключевые слова: лягушка травяная; триазиновые гербициды; микроядерный тест; хромосомные aberrации; нейтрофилы; эозинофилы; изменения в субпопуляционном составе лейкоцитов.

Triazine herbicide Simazine and Semerone do not increase the number of leukocytes with chromosome aberrations in common frog (*Rana temporaria* L.). It has been demonstrated difference white blood cells from red blood cells amphibians by the degree of cytogenetic response on the additional exposure. This can be explained by different rates of elimination of cells with damaged genetic apparatus, different rates of proliferation and differentiation. To identify features of the factors of different nature on the genetic apparatus of amphibians seem preferable to use red blood cells. Simazine and Semerone cause of changes in leukocyte subpopulations. Under the simazine action in the spring increased content of neutrophils spleen, which is probably due to a slow process of recovery from hibernation. In addition, Simazine called eosinophilia, which can be explained starting the process cell death. Semeron in the studied concentration is general cytotoxic effect on leukocytes common frog. On the background of a pronounced neutropenia and eosinopenia register the decrease in the number of white blood cells with chromosome aberrations. Detected seasonal difference in the amount and character caused in amphibians exposed to herbicides.

Key words: common frog; triazine herbicides; micronucleus test; chromosome aberrations; white blood cells; changes in leukocyte subpopulations.

Проблема воздействия на биологические системы используемых в сельскохозяйственной практике химических соединений в сочетании с такими вредными факторами, как радионуклеидное загрязнение почв, засоренность отходами и сбросами промышленных производств, приобретает в настоящее время особую актуальность и требует интенсивного изучения.

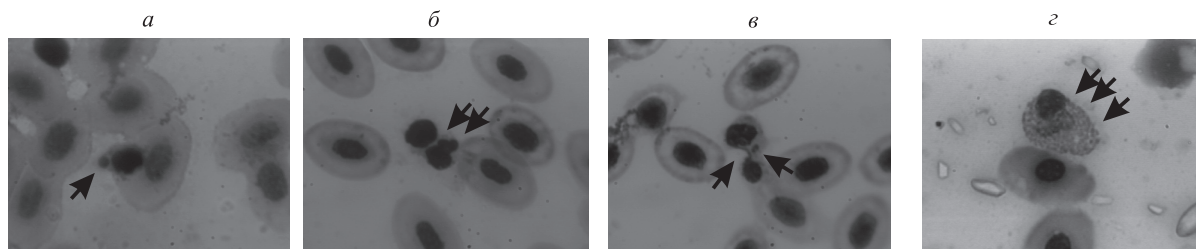
Один из главных элементов технологии возделывания сельскохозяйственных культур, снижающий засоренность посевов сорной растительностью, – применение гербицидов. Многие из них являются стойкими и сохраняются в почве до следующего вегетационного периода [1], что может приводить к загрязнению химическими соединениями территорий, занятых в сельскохозяйственном производстве, а также прилегающих к ним биоценозов. Известно, что пестицидные препараты проявляют генетические эффекты при воздействии на клетки и ткани живых организмов [2–4]. Сказанное в полной мере относится и к некоторым гербицидным препаратам триазинового ряда [5]. В связи с этим в настоящее время актуально проведение исследований действия пестицидов на биологические системы с расширением арсенала методических подходов, в том числе генетических.

Амфибии являются удобным модельным объектом для оценки экологического состояния водных и наземных сообществ. Способность поглощать и аккумулировать ксенобиотики, высокая чувствительность к разного рода воздействиям, а также другие особенности позволяют использовать данную группу позвоночных в качестве биоиндикаторов цитогенетической активности факторов различной природы [6, 7].

Цель настоящей работы – проведение сравнительного цитогенетического анализа действия триазиновых гербицидов симазина (ПО «Оргстекло», Россия, 80 % д. в. – 2-хлор-4,6-бис(этиламино)-1,3,5-триазин) и семерона (Ciba Specialty Chemicals, 25 % д. в. – 6-изопропиламино-4-метиламино-2-метилтио-1,3,5-триазин) на клетки лимфоидного ряда амфибий.

Материал и методика исследования

Объектом исследования служили бурые лягушки вида *Rana temporaria* L. (лягушка травяная), отловленные в пойме р. Птичь в окрестностях деревни Лецковщина Минского района. В связи с сезонными колебаниями пролиферативной активности тканей кровеносной системы животных их отлавливали в последней декаде марта (57 особей) и сентября (68 особей) [8]. Обработку гербицидами проводили непосредственно после отлова. Животных обоих полов содержали в стеклянных аквариумах емкостью 10 л при $t = 20\text{--}22^\circ\text{C}$. Плотность посадки составляла одна особь на один литр воды. Для эксперимента использовали водопроводную воду, отстоянную при комнатной температуре в течение 24 ч. В воду добавляли гербицидные препараты из расчета концентрации действующего вещества для семерона 1,0 и 3,0 мг/л, для симазина – 0,5 и 5,0 мг/л. Через 3,5 сут растворы меняли на свежие. Общее время обработки животных гербицидами составило 7 сут. Контролем служили особи, содержащиеся в воде без гербицида. Действие гербицидов оценивали по изменению количества микроядер в лейкоцитах. Некоторые типы проанализированных нарушений представлены на рисунке.



Различные типы нарушений генетического аппарата в лейкоцитах селезенки у травяной лягушки (*Rana temporaria* L.):

а – лейкоцит с микроядром; б – двуядерный лейкоцит с двумя микроядрами; в – не завершивший цитотомию лейкоцит с хроматидным мостом и фрагментом хромосомы; з – нормальный лейкоцит (эозинофил).

Увеличено в 1000 раз

Учитывали также изменение количественного состава сегментоядерных лейкоцитов (нейтрофилов и эозинофилов) после гербицидного воздействия. Лейкоциты выделяли из селезенки при помощи стандартной амфибийной среды «Gibco». Мазки готовили после осаждения суспензии клеток на центрифуге 3K30/7 (Sigma) при 1000 об/мин в течение 5 мин по общепринятой методике [9]. Высушенные на воздухе препараты фиксировали 96 % этанолом и окрашивали по методу Гимза [10]. От каждой особи анализировали по 350–500 клеток.

Анализ цитологических препаратов проводили с использованием микроскопа Axiostar (Carl Zeiss) при увеличении объектива 60× и 100× с масляной иммерсией. Микрофотографирование цитологических структур осуществляли с помощью системы анализа изображений «Морфолог», состоящей из микроскопа Jenaval (Carl Zeiss), телекамеры OS-45D (Oscar), фреймграббера MV-500 (Mutech) и компьютера (Pentium III – 733).

Статистическую обработку полученных результатов исследований проводили на персональном компьютере с помощью программ Excel 2003 и Statistica 6.0 с расчетом выборочной средней и стандартной ошибки среднего. После оценки параметричности выборок с помощью критерия Колмогорова – Смирнова использовали t-критерий Стьюдента для попарных сравнений или критерий Уилкоксона.

Результаты исследований и их обсуждение

Цитогенетический анализ действия триазинов во время весеннего пика размножения и обновления популяций клеток. Проведенный анализ показал, что при обработке животных гербицидами симазин и семерон изменения количества клеток с микроядрами не происходит. Как видно из табл. 1, при воздействии симазина количество лейкоцитов с нарушениями генетического аппарата не превысило контрольного значения. Так, при концентрациях гербицида 0,5 и 5,0 мг/л количество аберрантных клеток составило $0,14 \pm 0,08$ и $0,13 \pm 0,06$ % соответственно, в то время как в контроле данный параметр находился на уровне $0,16 \pm 0,06$ %. При обработке животных семероном при концентрациях 1,0 и 3,0 мг/л количество клеток с микроядрами составило $0,23 \pm 0,07$ и $0,09 \pm 0,06$ % соответственно. Статистическая обработка полученных данных показала, что отмеченное варьирование признака находилось в пределах ошибки выборки ($p > 0,05$).

Таблица 1

Влияние триазиновых гербицидов на генетический аппарат лейкоцитов и количество нейтрофилов и эозинофилов в селезенке травяных лягушек в весенний период

Концентрация гербицида, мг/л	Просмотрено клеток, абс. ед.	Количество лейкоцитов с микроядрами, %	Количество нейтрофилов, %	Количество эозинофилов, %
Контроль	4900	$0,16 \pm 0,06$	$0,80 \pm 0,13$	$2,61 \pm 0,23$
Симазин				
0,5	2200	$0,14 \pm 0,08$	$2,77 \pm 0,35^*$	$1,27 \pm 0,24^*$
5,0	3820	$0,13 \pm 0,06$	$2,04 \pm 0,23^*$	$3,69 \pm 0,31^*$
Семерон				
1,0	4440	$0,23 \pm 0,07$	$0,90 \pm 0,14$	$1,89 \pm 0,20$
3,0	2150	$0,09 \pm 0,06$	$0,05 \pm 0,05^*$	$1,91 \pm 0,30$

*Разница с контролем статистически достоверна при $p < 0,05$.

В селезенке животных, обработанных триазинами, в весенний период наблюдается изменение уровня сегментоядерных лейкоцитов. Например, при воздействии симазина при концентрациях 0,5 и 5,0 мг/л количество нейтрофилов составляло $2,77 \pm 0,35$ и $2,04 \pm 0,23$ % от общего количества спленоцитов соответственно, что в 3,1 и 2,3 раза превышало контрольную величину $0,80 \pm 0,13$ % ($p < 0,05$). Обработка животных симазинном приводила также к изменению уровня эозинофилов. Так, при концентрации ксенобиотика 0,5 мг/л количество этих клеток составило $1,27 \pm 0,24$ %, что статистически достоверно ниже контрольной величины в 2,1 раза ($p < 0,05$). При обработке животных симазинном концентрации 5,0 мг/л количество эозинофилов увеличивалось и составило $3,69 \pm 0,31$ %, что статистически достоверно превышало контрольный показатель в 1,4 раза ($p < 0,05$).

Повышенное содержание нейтрофилов характерно для зимующих животных. У амфибий в весенний период происходит изменение соотношения различных популяций клеток крови, при котором общее количество нейтрофилов в крови снижается. При содержании животных в среде с симазинном, вероятно, происходит замедление этого процесса. Увеличение количества эозинофилов и эозинофильных клеточных элементов является признаком запуска процесса клеточной гибели, связанной с элиминацией возникших многочисленных нарушений [11, 12].

Установлено, что семерон в изученных концентрациях оказывает общее цитотоксическое действие на клетки лейкоцитарного ряда амфибий. Так, при воздействии гербицида при концентрации 3,0 мг/л количество нейтрофилов снижалось более чем в 16 раз и составляло $0,05 \pm 0,05$ % против $0,80 \pm 0,13$ % в контроле ($p < 0,05$). Обработка животных семероном приводила к снижению количества эозинофилов. При воздействии ксенобиотика в концентрациях 1,0 и 3,0 мг/л относительное количество этого типа клеток составляло $1,89 \pm 0,20$ % и $1,91 \pm 0,30$ % от общего количества спленоцитов соответственно, что в 1,4 раза ниже контрольного показателя. Однако статистическая обработка полученных данных показала, что указанное изменение признака находилось в пределах ошибки выборки ($p > 0,05$).

Цитогенетический анализ действия триазинов в период осеннего затихания процессов кроветворения. Как видно из табл. 2, при обработке амфибий триазинами статистически достоверного увеличения уровня клеток с микроядрами не зарегистрировано. Так, при воздействии симазина в концентрациях 0,5 и 5,0 мг/л количество лейкоцитов с нарушениями генетического аппарата составило $0,15 \pm 0,06$ и $0,45 \pm 0,10$ % соответственно. В контроле данный параметр находился на уровне $0,29 \pm 0,06$ %. Проведенный анализ показал, что зарегистрированное варьирование признака не являлось статистически значимым ($p > 0,05$). При обработке животных семероном количество лейкоцитов с микроядрами уменьшалось. Так, у лягушек, обработанных гербицидом при концентрациях 1,0 и 3,0 мг/л, количество аберрантных клеток составило $0,16 \pm 0,06$ и $0,05 \pm 0,05$ %, что в 1,8 и 6,0 раза соответственно ниже контрольной величины ($p < 0,05$).

Таблица 2

Влияние триазиновых гербицидов на генетический аппарат лейкоцитов и количество нейтрофилов и эозинофилов в селезенке травяных лягушек в осенний период

Концентрация гербицида, мг/л	Просмотрено клеток, абс. ед.	Количество лейкоцитов с микроядрами, %	Количество нейтрофилов, %	Количество эозинофилов, %
Контроль	8200	$0,29 \pm 0,06$	$0,59 \pm 0,08$	$4,34 \pm 0,23$
Симазин				
0,5	4000	$0,15 \pm 0,06$	$0,75 \pm 0,14$	$6,63 \pm 0,39^*$
5,0	4410	$0,45 \pm 0,10$	$0,57 \pm 0,11$	$1,79 \pm 0,20^*$
Семерон				
1,0	4963	$0,16 \pm 0,06$	$0,22 \pm 0,07^*$	$0,81 \pm 0,20^*$
3,0	2150	$0,05 \pm 0,05^*$	$0,05 \pm 0,05^*$	$2,23 \pm 0,32^*$

*Разница с контролем статистически достоверна при $p < 0,05$.

Анализ количественного состава клеточных популяций спленоцитов животных, обработанных триазинами, в осенний период показал следующее. Симазин не вызывал изменения количества нейтрофилов. Так, при воздействии гербицида при концентрациях 0,5 и 5,0 мг/л относительное содержание этих клеток составило $0,75 \pm 0,14$ и $0,57 \pm 0,11$ % соответственно, что соразмерно контрольной величине $0,59 \pm 0,08$ % ($p > 0,05$). При действии симазина зарегистрировано изменение уровня эозинофилов. У лягушек, обработанных гербицидом при концентрации 0,5 мг/л, количество эозинофилов составляло $6,63 \pm 0,39$ %, что статистически достоверно выше в 1,5 раза, чем в контроле ($p < 0,05$). При обработке животных симозином в концентрации 5,0 мг/л происходило снижение числа эозинофилов в 2,4 раза, что также является статистически достоверным при $p < 0,05$.

Семерон в изученных концентрациях оказывает общее цитотоксическое действие на спленоциты животных, приводя к резкому снижению количества нейтрофилов и эозинофилов. Так, при концентрациях ксенобиотика 1,0 и 3,0 мг/л количество нейтрофилов составило $0,22 \pm 0,07$ и $0,05 \pm 0,05$ % соответственно, что в 2,7 и 11,8 раза меньше, чем в контроле ($p < 0,05$). При обработке животных семероном при концентрациях 1,0 и 3,0 мг/л количество эозинофилов снижалось до $0,81 \pm 0,20$ % и $2,23 \pm 0,32$ %, что в 5,4 и 1,9 раза ниже по отношению к контрольному параметру ($p < 0,05$).

Проведенный цитогенетический анализ показал, что в селезенке травяных лягушек количество лейкоцитов с нарушениями генетического аппарата в весенний и осенний периоды различалось. Так, у животных, отловленных весной, уровень аберрантных клеток составил $0,16 \pm 0,06$ %, а у животных, отловленных осенью, этот показатель находился на уровне $0,29 \pm 0,06$ %.

При действии гербицидов триазинового ряда – симазина и семерона – на травяных лягушек, как во время весеннего пика размножения и обновления популяций клеток, так и в осенний период, во время затихания процессов кроветворения, изменения количества лейкоцитов с абберациями хромосом не зарегистрировано. Ранее было показано, что симазин и семерон в аналогичных условиях у данного вида живых организмов увеличивают количество эритроцитов периферической крови с абберациями хромо-

сом, а также нарушают процесс деления клеток [13]. Следовательно, лейкоциты и эритроциты амфибий различаются по степени цитогенетического ответа на дополнительное воздействие, что может быть объяснено различной скоростью элиминации клеток с повреждениями генетического аппарата, а также пролиферации и дифференцировки [14]. Для выявления особенностей действия факторов различной природы на генетический аппарат амфибий представляется предпочтительным использовать эритроциты периферической крови.

Установлено, что симазин и семерон вызывают изменения в субпопуляционном составе клеток селезенки амфибий, причем реакция на воздействие этих ксенобиотиков зависит от сезонных ритмов кроветворения. При действии симазина в весенний период наблюдалось повышенное содержание нейтрофилов в селезенке, что связано, вероятно, с замедлением процесса выхода животных из зимней спячки. Кроме того, симазин вызывал эозинофилию, что можно объяснить запуском процесса клеточной гибели. Семерон в изученных концентрациях оказывал общее цитотоксическое действие на спленоциты животных. На фоне нейтро- и эозинопении происходило снижение количества аберрантных лейкоцитов. Цитотоксическое действие семерона было более выраженным в осенний период. Выявленные изменения в субпопуляционном составе лейкоцитов травяных лягушек свидетельствуют о необходимости ограничения присутствия триазиновых гербицидов симазина и семерона в природных экосистемах.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Holly K., Roberts H. A. Persistence of phytotoxic residues of triazine herbicides in soil // Weed Res. 1963. Vol. 3. P. 1.
2. Lander B. F., Knudsen L. E., Gamborg M. O., Järventausta H., Norppa H. Chromosome aberrations in pesticide-exposed greenhouse workers // Scand. J. Work. Environ. Health. 2000. Vol. 26. P. 436.
3. Zeljezic D., Garaj-Vrhovac V. Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides // Mutagenesis. 2001. Vol. 16. P. 359.
4. Chiu B. C., Blair A. Pesticides, chromosomal aberrations, and non-Hodgkin's lymphoma // J. Agromedicine. 2009. Vol. 14. P. 250.
5. Кожуро Ю. И., Максимова Н. П. Цитогенетический анализ действия гербицидов гезагарда, гранстара, зенкора и симазина на проростки ячменя (*Hordeum vulgare*) и гороха (*Pisum sativum*) // Вестн. НАН Беларуси. Сер. биол. наук. 2003. № 1. С. 41.
6. Clements C., Ralph S., Petras M. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay // Environ. Mol. Mutagen. 1997. Vol. 29. P. 277.
7. Гилева Э. А., Щупак Е. Л. Хромосомная нестабильность и содержание тяжелых металлов у амфибий из Юганского заповедника // Экология. 2005. № 1. С. 73.
8. Маслова М. Н., Тавровская Т. В. Сезонная динамика эритропоэза лягушки озерной *Rana temporaria* // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1993. Т. 29. С. 211.
9. Сапожников А. Г., Доросевич А. Е. Гистологическая и микроскопическая техника : руководство. Смоленск, 2000.
10. Ромейс Б. Микроскопическая техника. М., 1953.
11. Khogali F. A., Sheikh J. B., Rahman S. A., Rahim A. A., Daghestani M. H. Histopathological and hematological effects of Dimethoate 40EC on some organs of albino mice // J. King Saud. Univ. 2005. Vol. 18. P. 73.
12. Kurutas E. B., Doran F., Ciralik H. The effect of endosulfan on lactic dehydrogenase enzyme system in liver of mus musculus: a histochemical study // Eur. J. Gen. Med. 2006. Vol. 3. P. 148.
13. Кожуро Ю. И., Анисович М. В., Афонин В. Ю. Влияние триазиновых гербицидов симазина и семерона на цитогенетические параметры эритроцитов периферической крови пойкилотермных животных // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. 2013. № 2. С. 57.
14. Малашенко А. М., Игнатьева Е. Л., Бескова Т. Б. Моделирование периодически меняющегося прогнозируемого ответа на мутагенные воздействия у мышей СВА/LacY в ряду поколений инбридинга // Генетика. 2001. Т. 37. С. 1353.

Поступила в редакцию 10.02.2014.

Юрий Иосифович Кожуро – кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики.

Марина Владимировна Анисович – младший научный сотрудник лаборатории фармакогенетики ГНУ «Институт биорганической химии НАН Беларуси».

Виктор Юрьевич Афонин – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией фармакогенетики ГНУ «Институт биорганической химии НАН Беларуси».